

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT Rec'd PCT/PTO

REC'D 205 JAN 2005

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

10/521916

**CORRECTED
VERSION**



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/43161-PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/08199	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 25.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 26.07.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12P23/00		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I ☒ Grundlage des Bescheids
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)II) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25.02.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.12.04
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Lüdemann, S Tel. +49 89 2399-7842 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-25 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Sequenzen, Seiten

1-15 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-19 eingegangen am 05.10.2004 mit Schreiben vom 05.10.2004

Zeichnungen, Blätter

1/5-5/5 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/08199

☒ Ansprüche, Nr.: 20

☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-19
Nein: Ansprüche - |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-19
Nein: Ansprüche - |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche 1-19
Nein: Ansprüche - |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: SCHOEFS^A ^B ET AL: 'Astaxanthin accumulation in Haematococcus requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids' FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 500, Nr. 3, 6. Juli 2001 (2001-07-06), Seiten 125-128, XP004251391 ISSN: 0014-5793
- D2: US 2002/051998 A1 (SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA ET AL) 2. Mai 2002 (2002-05-02)
- D3: DE 100 51 175 A (BASF AG) 2. Mai 2002 (2002-05-02)
- D4: SCHMIDT-DANNERT CLAUDIA: 'Engineering novel carotenoids in microorganisms' CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 11, Nr. 3, Juni 2000 (2000-06), Seiten 255-261, XP002261192 ISSN: 0958-1669

2. Die mit 5.10.2004 eingereichten Änderungen erfüllen die Kriterien des Art. 34(2)(b) PCT.

- 3.1 D1 offenbart die Oxidation von β -Carotin zu Astaxanthin in Haematococcus und liefert den Beweis, daß Cytochrom P450 in die Oxidation involviert ist.
- 3.2 D2 offenbart, daß die bakteriellen Monooxygenasen Cytochrom P450 BM-3 und P450cam (die nicht aus *Thermus sp.* stammen) für die Oxidation von verschiedenen Metaboliten wie z.B. Carotinoiden oder Terpenoiden eingesetzt werden können.
- 3.3 D3 offenbart die Isolierung und Klonierung des CYP175A1-Cytochrom P450 gens aus *Thermus thermophilus*. D3 offenbart diverse mögliche Substrate der Cytochrom P450 Monooxygenasen: z.B. Ionone, die Terpenverbindungen sind, allerdings keine Carotinoide.

- 3.4 D4 offenbart das Engineering von Carotinoid-Biosynthese Enzymen. Das Assemblieren diverser dieser (crt) Gene für die Generierung neuer metabolischer Pfade wird diskutiert. Es werden keine Cytochrom P450-Enzyme aus *Thermus sp.* offenbart.
- 4.1 Geht man also von D3 als dem nächsten Stand der Technik aus, so besteht die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe in der Bereitstellung einer weiteren Anwendung für das vorliegende Enzym aus *Thermus sp.*
- 4.2 Die Lösung dieser Aufgabe besteht in der Oxidation von Carotinoiden als Substraten und ist nicht naheliegend, da der Fachmann weder durch D3 allein oder in Kombination mit einem der Dokumente D1, D2 oder D4 einen Hinweis ableiten kann, dass Carotinoide auch Substrate der aus *Thermus sp.* isolierten P450 Cytochrom Monooxygenase sein können.
- 4.3 Daher erfüllen die vorliegenden Ansprüche 1-19 die Erfordernisse hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der industriellen Anwendbarkeit gemäss Art. 33(2), 33(3) und 33(4) PCT.

PF 0000053791

1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Oxidation von Carotinoiden, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Carotinoid in Gegenwart eines Enzyms mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität aus Bakterien der Gattung *Thermus sp.* umsetzt und das Oxidationsprodukt isoliert.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - a1) einen rekombinanten Mikroorganismus, welcher ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität produziert, in einem Kulturmedium in Gegenwart von exogenem oder intermediär gebildetem β -Carotin kultiviert; oder
10
 - a2) ein β -Carotin-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität inkubiert; und
 - b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.
15
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Oxidationsprodukt Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Adonirubin, Astaxanthin, Lutein oder Gemische davon umfasst.
- 20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oxidation durch Kultivierung des Mikroorganismus in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus durch heterologe Komplementierung zur Carotinoidproduktion befähigt ist und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimiert.
- 30 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Carotinoid als exogenes Substrat einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat

M/43191

PF 0000053791

2

einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten enthält.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Cytochrom P450 Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.
- 20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus einer Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus* verwendet.
- 30 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche wobei man einen rekombinanten Mikroorganismus kultiviert, der ein Expressionskonstrukt trägt, welches unter der Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 umfasst.
13. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 oder einer dafür kodierenden Nukleotidsequenz zur mikrobiologischen Oxidation von Carotinoiden.
14. Rekombinanter Mikroorganismus, welcher durch heterologe Komplementierung zur β -

M/43191

PF 0000053791

3

Carotinproduktion befähigt ist und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimiert.

- 5 15. Mikroorganismus nach Anspruch 14, welcher mit carotinogenen Genen heterolog komplementiert ist.
16. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 und 15, abgeleitet von Bakterien der Gattung *Escherichia* sp.
- 10 17. Mikroorganismus nach Anspruch 16, abgeleitet von *E. coli*, insbesondere *E. coli* JM 109.
- 15 18. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 17, transformiert mit einem Expressionsvektor, der unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 umfasst.
- 20 19. Expressionsvektor, umfassend die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 welche stromaufwärts mit dem starken *tac*-Promotor und stromabwärts mit dem starken *rrnB* ribosomalen Terminator operativ verknüpft ist.